Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 243- 257

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397، ص. 257-243

بهینه‌سازی تولید پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی گرده زنبور عسل با آلکالاز و مقایسه با ژله رویال

عاطفه مقصودلو[1]- علیرضا صادقی ماهونک*[2]- محمد قربانی[2]- فیدل تولدرا[3]

تاریخ دریافت: 1395/09/01
تاریخ پذیرش: 1396/02/02

چکیده

در این پژوهش تاثیر هیدرولیزآنزیمی پروتئین‌گرده‌گل توسط آنزیم آلکالاز بر خواص‌آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی آنزیمACE بررسی و با ژله‌رویال مقایسه‌گردید. ترکیبات فنلی، فعالیت‌مهارکنندگی‌رادیکالDPPH، قدرت احیاکنندگی‌گرده‌گل و ژله‌رویال اندازه‌گیری شد که مقادیر آنها برای غلظت 1000 میلی‌گرم برلیترگرده‌گل و ژله‌رویال، به‌ترتیب 174 و 1031/71 میلی‌گرم اسیدگالیک برگرم نمونه، 67/33% و 95/27% و جذب 0/8 و 0/77 در طول موج 700 نانومتر بود. بیشترین قدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز 1/5% و مدت زمان هیدرولیز 2/5 ساعت، 0/756 بود. بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز 1% و مدت زمان هیدرولیز 4 ساعت، 78/48% بود. بیشترین قدرت مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز1/5% و مدت زمان هیدرولیز 4 ساعت 87/07% بود. نتایج نشان داد که با انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH و آنزیم ACE گرده گل به‌ترتیب از 67/33% و 15/54% به 78/48% و 87/07 % ارتقا پیدا کرد. بنابراین بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال و آنزیم ACE گرده‌گل، از نظر عددی نسبت به ژله رویال افزایش پیداکرد. با توجه به اینکه تنها منبع اصلی پروتئینی زنبور برای تهیه ژله رویال، گرده گل است، می‌توان گفت که با هیدرولیز شدن پروتئین‌های گرده گل، تا حدی می‌توان آنها را به پپتیدهای موجود در ژله رویال نزدیک کرد.

واژه‌های کلیدی: گرده گل، ژله رویال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آلکالاز، آنزیم مبدل آنژیوتنسین، پپتیدهای زیست فعال، بهینه‌سازی

مقدمه

گرده گل با 10 تا 40 درصد پروتئین که توسط زنبور عسل جمع‌آوری می‌شود، از آگلوتینه شدن گرده گل‌ها با شهد آنها و بزاق زنبور عسل به‌دست می‌آید و پس از ذخیره در کیسه گرده واقع در بند سوم پای زنبور عسل، در هنگام ورود زنبور عسل به درون کندو در تله گرده که توسط زنبوردار در آنجا تعبیه شده جمع آوری می‌گردد (پاسکوال، 2013). ژله رویال با 27 تا 41 که به‌عنوان غنی‌ترین ماده مغذی بیولوژیک شناخته شده توسط آنزیم‌های پروتئازی و دیگر آنزیم‌های طبیعی زنبور عسل، از هضم مستقیم گرده به وجود آمده و از دو جفت غده هیپوفارنژیال[4] موجود در طرفین سر زنبور عسل[5] کارگر جوان ترشح می‌شود، (بوگدانو، 2014؛ مورایز و همکاران، 2011). مشخص‌شده است که ویژگی آنتی‌اکسیدانی ژله رویال و گرده زنبور عسل مربوط به پروتئین‌های اصلی و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها بوده (ناگای و اینو، 2004) و دی و تری پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز نشده از خود نشان می‌دهند (کاواشیما و همکاران، 1979؛ گیو و همکاران، 2009). دلایل مربوط به عملکردآنتی‌اکسیدانی این پپتیدها شامل موارد زیر می‌باشد: قابلیت احیاء و فعالیت پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد، خاصیت خنثی‌کنندگی برخی از ترکیبات سمی همانند رادیکال‌های هیدروکسیل و خاصیت شلاته‌کنندگی کاتیون‌های فلزی پراکسیدان (کیشیمورا و بنجاکول، 2011). گزارش شده است که پپتیدهای به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، تریپسین و آلکالاز دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (ویریافان و همکاران، 2012؛

1 و 2- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
3- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه والنسیا، اسپانیا
(* - نویسنده مسئول: Email: Sadeghiaz@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v0i0.60468

4 Hypopharyngeal

5 Apis mellifera

خانتافانت و همکاران، 2008). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژله رویال در مدل‌های آزمایشگاهی بر روی گیاهان و مخمرها و همچنین اثر محافظتی آن در مقابل تنش‌های اکسیداتیو در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است؛ این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری کرده است (لیو، 2008؛ ناگای و همکاران، 2005). گزارش شده است پپتیدهای ژله رویال که از فعالیت پروتئازهای مختلف به‌دست می‌آیند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی فشار خون بالایی را از خود نشان می‌دهند (گیو و همکاران، 2009). آلمیدا و همکاران (2016) نشان دادند ترکیبات فنلی موجود در عصاره گرده گل با ویژگی آنتی‌اکسیدانی مناسب، به‌طور چشمگیری باعث کاهش واکنش‌های اکسایشی در سوسیس گردید. مارینوا و تچوربانو (2010)، با استفاده از پروتئیناز و آمینو پپتیدازهای با منشاء گیاهی از جمله بروملائین آناناس، آمینوپپتیداز و پرولین ایمینوپپتیداز برگ کلم و آمینوپپتیداز نخود، به هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل پرداختند و ویژگی‌های مهارکنندگی‌رادیکال DPPH پپتیدهای به‌دست‌آمده را مورد بررسی قرار دادند. پپتیدهایی که بیشترین فعایت بازدارندگی از خود نشان داد، شناسایی و وزن مولکولی آنها مشخص شد و به‌عنوان غذای عملگر مورد استفاده قرار گرفتند. در کشور ما ایران، این محصولات با ارزش جایگاه خود را در صنایع غذایی و دارویی به‌طور کامل به‌دست نیاورده اند. بنابراین لازم است با بررسی ویژگی‌های کاربردی آنها و قابلیت کاربردشان در مواد غذایی به‌عنوان یک افزودنی طبیعی و سلامتی بخش و جلوگیری‌کننده از بسیاری از بیماری‌ها، توجه بسیاری از متخصصان در صنعت غذا، زنبورداری و داروسازی به این محصولات معطوف گردد. هدف از انجام این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل و بررسی تاثیر هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل بر خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد. به‌کارگیری هرچه بیشتر محصولات جانبی زنبورعسل در صنایع غذایی و دارویی و افزایش تقاضا برای این محصولات، باعث افزایش فعالیت زنبورداران و تولیدکنندگان محصولات زنبورعسل و به دنبال آن درآمدزایی و ارزآوری بیشتر در این زمینه خواهد شد؛ ضمنا از خروج این محصولا ت به خارج از کشور با قیمت ناچیز جلوگیری خواهد شد؛ از طرفی دیگر با به‌کارگیری این مواد زیست‌فعال با ارزش در فرمولاسیون مواد غذایی گامی به سوی حفظ سلامت جامعه و جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها برداشته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. گرده گل و ژله رویال از مرکز پرورش زنبورعسل و خدمات گرده افشانی واقع درگنبد، آنزیم‌های آلکالاز و ACE و سوبسترای آن از شرکت سیگما و سایر مواد آزمایشگاهی شامل اسید سولفوریک، هیدروکسید سدیم، اسید بوریک، اسید کلریدریک، تریس، مونوسدیم فسفات، دی‌سدیم فسفات، تری‌کلرواستیک اسید، اتانول، پتاسیم فری سیانید، کلرید فریک، کلرید فرو و رادیکال آزاد DPPH و اتیل استات از شرکت‌های مرک و تتراکم با درجه خلوص آزمایشگاهی تهیه شدند.

سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی گرده و ژل رویال

به‌منظور تهیه عصاره آبی گرده گل، پودر گرده با نسبت 1 به 10 در آب مخلوط گردید و در دمای محیط به مدت 24 ساعت با همزن مغناطیسی حل گردید. سپس بخش جامد آن با استفاده از کاغذ صافی واتمن جداسازی شد. عصاره به‌دست آمده با دورg ×12000سانتریفوژ گردید، سوپرناتانت به‌دست‌آمده با استفاده از فریز درایر خشک شد (مورایز و همکاران، 2011).

عصاره آبی ژل رویال با استفاده از روش لیو و همکاران (2008) تهیه شد. به این منظور ژل رویال با آب مقطر به نسبت 1 به 10 رقیق گردید و با استفاده از اولتراسوند مدت 10 دقیقه حل شد. سپس محلول حاصل به مدت 10 دقیقه با دور× g 15000 سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل به‌عنوان عصاره ژل رویال برای سنجش ویژگی‌های آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، با استفاده از روش فولین سیوکالته انجام شد. به این منظور 500 میکرولیتر از هر غلظت عصاره گرده با 500 میکرولیتر معرف فولین سیوکالته و 500 میکرولیتر محلول کربنات سدیم 10 درصد وزنی/ حجمی مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در مکان تاریک اینکوبه شد؛ در نهایت جذب آن در طول موج 700 نانومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌لیتر عصاره از روی معادله خط منحنی استاندارد تعیین گردید (دشپنده، 1987).

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از روش همیدت و همکاران (2011) انجام شد. به این منظور 1 میلی-لیتر از عصاره حل شده در اتانول با یک میلی‌لیتر از محلول DPPH اتانولی با غلظت 0/1 میلی‌مولار مخلوط شد، سپس به مدت 50 دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. جذب مخلوط در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. در نهایت فعالیت مهارکنندگی بر اساس درصد، طبق فرمول زیر محاسبه شد که در آن A_0 جذب کنترل و A_1 جذب نمونه است.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH = $((A_0 - A_1)/A_0)\times 100$ (1)

سنجش قدرت احیاکنندگی

اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی گرده گل در احیای یون آهن با استفاده از از روش بوگاتف و همکاران (2009) انجام شد. به این منظور 1 میلی‌لیتر از محلول عصاره با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات pH =6/6 و 2/5 میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید 1 درصد مخلوط گردید و به مدت نیم ساعت در حمام آب 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس 2/5 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید 10 درصد وزنی/ حجمی به آن اضافه شد. پس از 10 دقیقه سانتریفوژ با دور 1650×g، 2/5 میلی‌لیتر از سوپرناتانت برداشته شد و به آن 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر محلول کلریدآهن 0/1 درصد اضافه شد. پس از 10 دقیقه جذب آن در طول موج 700 نانومتر خوانده شد. میزان جذب با قدرت احیاکنندگی همبستگی مستقیم و مثبت دارد.

هیدرولیز آنزیمی گرده گل

هیدرولیز گرده گل توسط آنزیم آلکالاز در دما و pH اپتیمم این آنزیم انجام شد. آنزیم در محدوده غلظتی ا تا 2 درصد وزنی/ وزنی به محلول پروتئینی افزوده شده و هیدرولیز بر اساس نقاط مشخص‌شده با طرح مرکب مرکزی در محدوده زمانی 2 تا 5 ساعت و دمای50 درجه سانتی‌گراد و pH=8 در انکوباتورهای شیکردار و در دما و pH ثابت انجام شد. در انتها در دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد (ویگو و همکاران، 2000). برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ در 4000×g به مدت 30 دقیقه انجام شد و سوپرناتانت پس از جمع‌آوری با خشک‌کن انجمادی خشک شد (ویلانوا و همکاران، 1999؛ گیو، 2005؛ ماتسوکا و همکاران، 2012) .

بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از گرده گل

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده DPPH با استفاده از روش همیدت و همکاران (2011) انجام شد.

سنجش قدرت احیاکنندگی

سنجش قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از از روش بوگاتف و همکاران (2009) انجام شد.

اثر بازدارندگی از آنزیم ACE (افزایش‌دهنده فشارخون)

این آزمون بر طبق روش شرح داده شده توسط ناکامورا و همکاران (1995) انجام شد. بر اساس این روش 80 میکرولیتر از گرده هیدرولیز شده با 200 میکرولیتر HHL[1] مخلوط گردید و به مدت 3 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش با افزودن 20 میکرولیتر آنزیم ACE[2] با غلظت 0/1 U/mL آغاز شد و به مدت نیم ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد ادامه یافت؛ سپس با افزودن 250 میکرولیتر اسیدکلریدریک 0/05 مولار متوقف گردید. در مرحله بعد 1/7 میلی‌لیتر اتیل استات به مخلوط اضافه شد و به مدت 15 دقیقه با دور 800×g سانتریفوژ شد. جهت تبخیر اتیل استات، سوپرناتانت به‌دست‌آمده به مدت 10 دقیقه در آون با دمای 95 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. رسوب باقیمانده در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و جذب آن در طیف‌سنج نوری با طول موج 228 نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد بازدارندگی از آنزیم ACE توسط رابطه زیر محاسبه گردید (نصری و همکاران، 2013).

ACE درصد بازدارندگی = ((B-A) /B) ×100 (2)

A: جذب مخلوط آنزیم ACE، HHL و پروتئین هیدرولیز شده و B: جذب مخلوط آنزیم ACE و HHL.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی قبل از انجام هیدرولیز بر اساس طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار spss و در سه تکرار انجام شد. تیماربندی و بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت با در نقاط مشخص‌شده با طرح مرکب مرکزی RSM انجام شد.

نتایج و بحث

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی اولیه بر روی گرده گل و ژله رویال

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

معادله رگرسیون خطی که رابطه غلظت محلول اسید گالیک را با میزان جذب نمونه‌ها در طول موج 700 نانومتر نشان می‌دهد، به‌صورت زیر می‌باشد:

$$Y= 0/0011X + 0/0196 \qquad R^2= 0/98 \qquad (3)$$

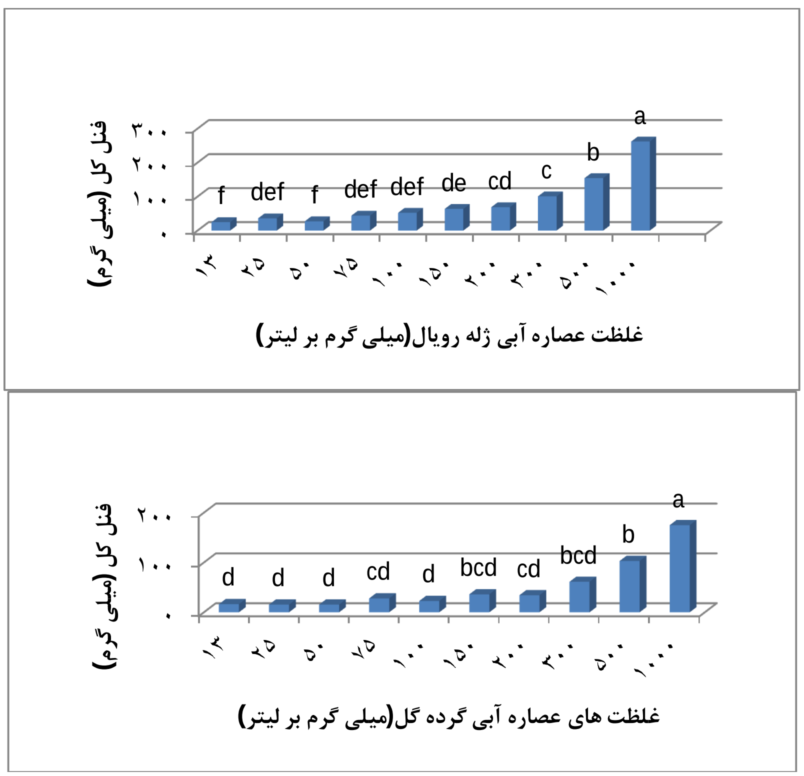
در این رابطه ، Y و X به‌ترتیب معادل جذب نمونه در طول موج 700 نانومتر و مقدار کل ترکیبات فنلی بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر گرم گرده گل می‌باشد. شکل1 مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنلی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می‌دهد. میزان ترکیبات فنلی گرده گل بین 15/48 تا

---

1 - N-Hippuryl-His-Leuhydrate

2 -Angenoteinssin Converting Enzyme

74 میلی‌گرم اسید گالیک برگرم گرده و میـزان ترکیبـات فنلـی ژلـه رویال بین 24/9 و 261/87 میلی‌گرم اسید گالیک بـر هـر گـرم ژلـه رویال متغیر بود. روند تغییرات میزان ترکیبات فنلی هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود و این تغییـرات در غلظـت‌هـای 200 تـا 1000 میلی‌گرم بر لیتر معنی‌دار بود. میزان ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در این پژوهش،بـا نتـایج سـایر پژوهشـگران مطابقـت داشـت. به‌عنوان مثال آلمیدا و همکاران (2016)، میزان ترکیبات فنلی عصاره اتانولی گرده گل را 19/69 میلی گرم گالیک اسید بر گرم گـرده گـل گزارش کردند. داوود و همکاران (2015)، ترکیبات فنلی عصاره آبـی گرده گل دو واریته خرما را در محدوده 5/4 تـا 237/74 و 13/42 تـا 197/62 میلی‌گرم گالیک اسید بر گـرم گـرده گـل گـزارش کردنـد. پاسکوال و همکاران (2013)، میزان ترکیبات فنلـی عصـاره متـانولی هشت نوع گرده تجاری از اسپانیا و پرتغـال را در محـدوده 18/5 تـا 32/15 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گرده گل گزارش کردنـد. لیـو و همکاران (2008)، میزان ترکیبات فنلی ژله رویـال را در حـدود 220 میکرو گرم گالیک اسید بر گـرم ژلـه رویـال گـزارش کردنـد کـه در مقایسه با ترکیبات فنلی ژله رویال مورد آزمـون در پـژوهش حاضـر بسیار کمتر است. اختلاف میزان ترکیبات فنلـی در ایـن پـژوهش در مقایسه با برخی کارهای پژوهشی دیگر را می‌توان درضرورت به‌کـار گیری آب به‌عنوان حلال به‌منظور استخراج ترکیبـات فنلـی در ایـن پژوهش نسبت داد. چرا که احتمالا قابلیت اسـتخراج ترکیبـات فنلـی غیرقطبی در این پژوهش، با حـلال قطبـی آب، پـایین بـوده اسـت. لبلانس و همکاران (2009) اعلام کردند در نوع حلال مورد اسـتفاده برای استخراج ترکیبات فنلی، درجه پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی گرده گل و ژله رویال و واکنش‌های آنهـا بـا هـم، فاکتورهـای ژنتیکـی و مناطق جغرافیایی، تک گل یا چند گل بودن گـرده در میـزان و نـوع ترکیبات فنلی گرده‌ها و ژله رویال مناطق مختلف تاثیرگذار می‌باشد. با توجه به اینکه ژله رویال از هضم مستقیم گرده گل توسط زنبور عسل حاصل می‌شود، از نظر میزان ترکیبات فنلی با یکدیگر قابل مقایسـه هستند (بوگدانو، 2014). در این پژوهش نیز مشخص شد که هـم در گرده گل و هم در ژله رویال با افزایش غلظت عصاره، میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت.



شکل1- میزان ترکیبات فنلی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

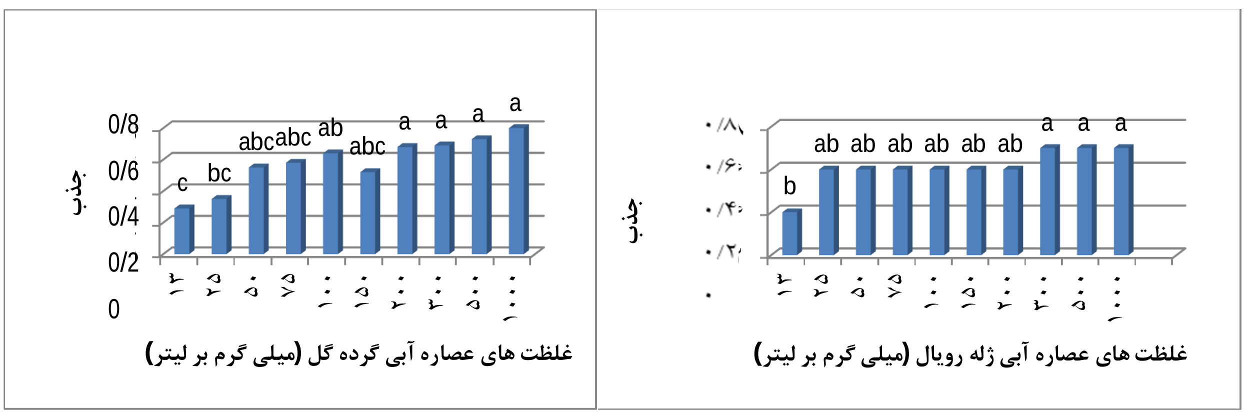
قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی

در این روش، احیا یون آهن سه ظرفیتی به‌عنوان معیـاری بـرای قابلیت الکترون‌دهی ترکیبات فنلی به‌کار می رود. این مسئله، سازوکار مهمی را در فرایند اکسایش ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهـد. ظرفیـت دهندگی الکترون (نیروی احیاکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشـد (عربشـاهی، 2001). در شـکل 2 مقایسـه

میانگین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال بر اساس میزان جذب در طول موج 700 مشخص‌شده است، این نتایج حاکی از آن بود که قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره گرده گل بین 0/29 تا 0/8 و میزان قدرت احیاکنندگی ژله رویال بین 0/74 و 0/77 متغیر بود. روند تغییرات میزان قدرت احیاکنندگی هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود، به‌طوریکه اختلاف‌ها، در غلظت‌های 12/5 و 25 با غلظت‌های بالاتر از 200 و 300 میلی‌گرم بر لیتر معنی‌دار بود (P<0/05) که با نتایج موریرا و همکاران (2011) مطابقت داشت. اما قدرت احیاکنندگی ژله رویال و گرده گل اختلاف معنی‌دار و مشخصی نداشتند که می‌توان دلیل آن را یکسان بودن نسبی میزان ترکیبات احیاکننده یون آهن، در گرده گل و ژله رویال دانست (بوگدانو، 2014). موراریز و همکاران (2011)، گزارش کردند که کمترین و بیشترین غلظت عصاره فنلی گرده به‌ترتیب کمترین و بیشترین قدرت احیاکنندگی یون آهن را داشتند و قدرت احیاکنندگی غلظتهای میانی تفاوت معنی‌داری نداشتند. کم شدن قدرت احیاکنندگی یون آهن با کاهش غلظت ترکیبات فنلی عصاره را لبلانس و همکاران (2009) و مارقیتاش و همکاران (2009) نیز تایید کردند. آنها اعلام کردند با افزایش غلظت ترکیبات فنلی عصاره‌های گرده گل، میزان قدرت احیای یون آهن افزایش می‌یابد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

شکل 3 نتایج مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می‌دهد. در این شکل‌ها مشخص است که کمترین و بیشترین میزان درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در گرده گل 1/05 و 67/33 درصد و در ژله رویال 3/75 و 95/27 درصد بود. روند تغییرات درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود؛ به‌طوری که اختلاف در بیشترین غلظت با سایر غلظت‌ها به‌طور قابل‌توجهی معنی‌دار بود (P<0/0005). سان و همکاران (2007) و کروير و هگدوس (2001)، و موراریز و همکاران (2011)، نیز گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های فنلی وابسته به غلظت بوده و با



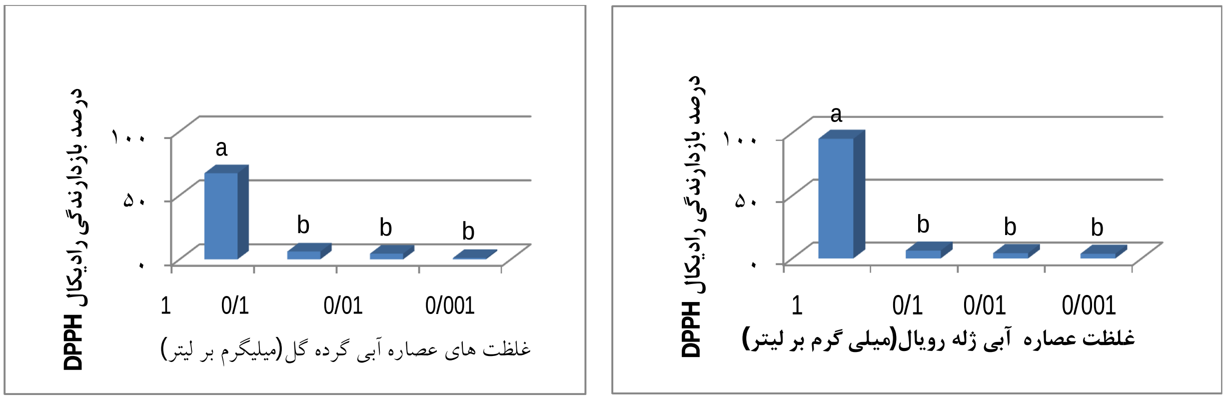
شکل2- قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد. لیو و همکاران (2008)، میزان قدرت مهار رادیکال DPPH ژله رویال را 65 درصد گزارش کردند. قدرت مهار رادیکال DPPH بالاترین غلظت ژله رویال مورد آزمون در پژوهش حاضر، 95/27 درصد بود که در مقایسه با گزارش لیو و همکاران (2008) بسیار بالاتر است. این مسئله را می‌توان به تفاوت در میزان ترکیبات فنلی ژله رویال، منطقه جغرافیایی و پروفایل پروتئینی و پپتیدهای آنتی‌اکسیدان موجود در ژله رویال نسبت داد. بین قدرت مهار رادیکال گرده گل و ژله رویال، اختلاف قابل‌توجهی مشاهده شد. این اختلاف در بالاترین غلظت عصاره‌های گرده گل و ژله رویال به بیشترین مقدار خود، یعنی 28 درصد رسید. دلیل بیشتر بودن قدرت مهار رادیکال ژله رویال نسبت به گرده گل را می‌توان به حضور بیشتر پروتئین‌ها و پپتیدهایی در ژله رویال نسبت داد که زنجیره جانبی آنها قابلیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند. ناگای و اینو (2004) نشان دادند که پروتئین‌های ژله رویال دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. گیو و همکاران (2005) پپتیدهای آنتی‌اکسیدان را از پروتئین‌های محلول در آب ژله رویال جداسازی و شناسایی کردند.

بهینه‌سازی هیدرولیز گرده گل و آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

با توجه به نقاط تعریف‌شده در RSM، آزمون‌های مربوطه انجام

شد. نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده در نقاط مشخص‌شده با طرح مرکب مرکزی در جدول 1 آورده شده است. در مرحله بعد داده‌های به‌دست‌آمده تجزیه‌وتحلیل شدند. ضرایب رگرسیونی و جدول تجزیه واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها برای آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی، مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار آنزیم ACE به‌ترتیب مطابق با جداول2، 3 و 4 می‌باشد.



شکل 3- اثر بازدارندگی از رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

جدول 1- نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در نقاط مشخص‌شده با طرح مرکب مرکزی

تیمار	غلظت آنزیم (%)	زمان (ساعت)	درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکالDPPH	قدرت احیاکنندگی (میزان جذب در 700 نانومتر)	فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE
1	2	1	41/93	0/614	35/84
2	1/5	1	27/86	0/708	67/28
3	1	1	34	0/698	42/23
4	2	2/5	49/49	0/688	45/59
5	1/5	2/5	36/34	0/755	72/72
6	1/5	2/5	37/35	0/756	73/72
7	1/5	2/5	36/34	0/755	71/72
8	1/5	2/5	37/35	0/756	74/72
9	1/5	2/5	35/34	0/756	73/27
10	1	2/5	48/23	0/721	40/36
11	2	4	78/46	0/658	49/41
12	1/5	4	59/63	0/701	87/08
13	1	4	78/46	0/641	68/26

قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ-های قدرت احیاکنندگی گرده هیدرولیز شده در جدول 2 ذکر شده است. بهترین مدل برای بیان رابطه قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی گرده هیدرولیز شده با متغیرهای واکنش، مدل درجه دوم با ضریب تعیین (R^2=0/99) می‌باشد. این رابطه در معادله 2 نشان داده شده است که در آنها X_1 و X_2 به‌ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و Y قدرت احیاکنندگی می‌باشد.

$$Y= 0/33195 + 0/06153\ X_1 + 0/49947\ X_2 - 0/0229\ X_1^2 - 0/2057 X_2^2 + 0/03367\ X_1X_2 \quad (4)$$

نتایج جدول2 نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر قدرت احیاکنندگی گرده گل هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های آلکالاز مناسب می‌باشد (R^2=0/99). اثر درجه دوم و اثر متقابل هریک از متغیرها بر روی پاسخ آزمایش، معنی‌دار بود($P<0/0001$). جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این آزمایش از شاخص عدم برازش مدل استفاده شد که با توجه به نتایج

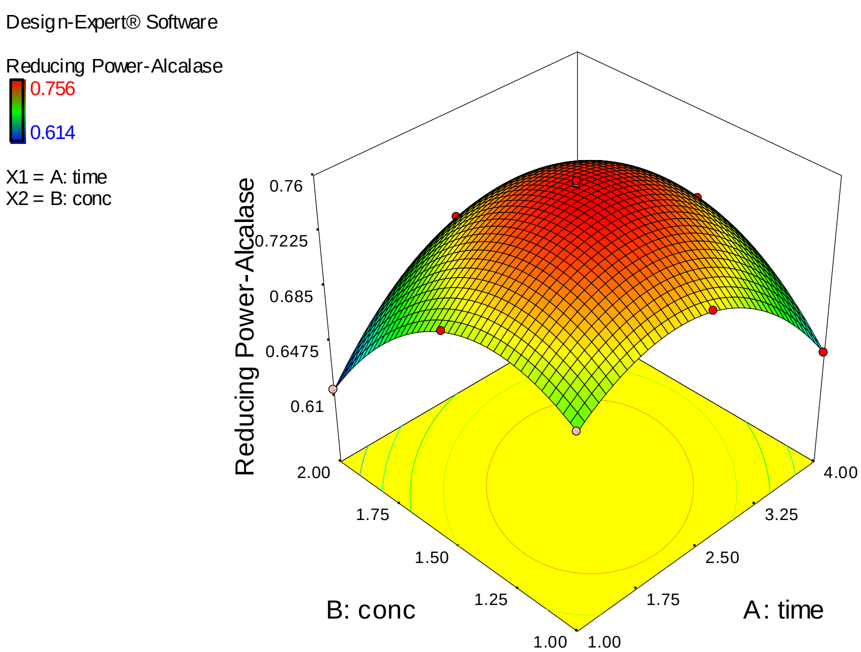
جدول، این فرض معنی‌دار نشد (P>0/05). این مسئله بیانگر آن است که مدل به‌خوبی با داده‌های مربوط بـه قـدرت احیاکننـدگی گـرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

جدول 2- جدول تجزیه واریانس برای فعالیت احیاکنندگی یون آهن

	درجه آزادی	ضریب رگرسیون	P عدد
مدل	5	0/33195	<0/0001
X_1(زمان)	1	0/06153	<0/0001
X_2(غلظت آنزیم)	1	0/49947	<0/0001
X_1^2	1	-0/0229	<0/0001
X_2^2	1	-0/2057	<0/0001
X_1X_2	1	0/03367	<0/0001
Lack of fitness	3		0/69
R^2- Pred		0/99	
R^2- Adj		0/99	

نمـودار صـفحه‌ای اثـر زمـان و غظـت آنـزیم بـر روی قـدرت احیاکنندگی گرده هیدرولیز شده توسط آلکالاز در شکل 4 نشـان داده شده است. همانطور که در شکل 4 مشخص اسـت، بیشـترین قـدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز، 0/756 بود کـه مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم 1/5 درصد و مدت زمان هیدرولیز 2/5 ساعت می‌باشد. در گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز، با افزایش زمان هیدرولیز تا چهار ساعت و غلظت آنزیم تا 2 درصـد، روند تغییرات قدرت احیاکنندگی ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بود.

این روند افزایشـی و سـپس کاهشـی در قـدرت احیاکننـدگی را می‌توان به نوع و ماهیت آنـزیم پروتئـازی آلکـالاز و شـرایط انجـام واکنش، اندوپپتیداز یا اگزوپپتیداز بودن مرتبط دانست. این ویژگی‌ها در نوع پپتیدهای بدست‌آمده و اهـدای الکتـرون در احیـای یـون آهـن تاثیرگذار است. آنزیم آلکالاز جزء پروتئازهای سرینی می‌باشد کـه در جایگاه فعال خود دارای اسیدآمینه سرین است. ایـن آنـزیم بـا حملـه نوکلئوفیلی به پیوندهای آمیدی، باعث شکسته شدن پروتئین و تولید پپتید می‌گردد. آلکالاز دارای بازده بالاتر در پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهایی با طول زنجیره کوتـاه‌تـر و ویژگـی‌هـای آنتـی‌اکسـیدانی مناسب‌تر نسبت بـه برخـی پروتئازهـای دیگـر اسـت (اویسـی‌پـور و همکاران، 2009).



شکل 4- نمودار سطحی برای قدرت احیاکنندگی گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم آلکالاز (درصد)

لی و همکاران (2008) گزارش کردند که فعالیت آنتـی‌اکسـیدانی پپتیدهایی با وزن مولکولی 500 تا 1500 دالتـون بسـیار قـوی‌تـر از پپتیدهایی با اوزان مولکولی کمتر یا بیشتر از این محدوده مـی‌باشـد. لاسود و همکاران (2015)، اعلام کردند علاوه بر اختلاف در شـرایط آزمایش و نوع آنزیم‌های مورد استفاده، نوع سوبسترا و توالی اسیدآمینه پپتیدهای تشکیل شده، درجه هیدرولیز و طـول زنجیـره پپتیـدی در عملکرد آن در احیای یـون آهـن مـوثر اسـت. گـئوارد و همکـاران (2002)، اعلام کردند با افزایش غلظت آنزیم، میزان تولید پپتیـدهای

آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده تا حد زیادی تحت تاثیر ترکیب آمینواسیدهای تشکیل دهنده آنها قرار دارد. به‌عنوان مثال پپتیدهای حاوی آمینو اسیدهای آروماتیک می‌توانند با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، باعث تبدیل آنها به فرم پایدار شوند (جی و همکاران، 2008).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ‌های فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده در جدول 3 ذکر شده است. تجزیه‌وتحلیل سطح پاسخ نشان می‌دهد که بهترین مدل برای بیان رابطه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با متغیرهای واکنش، مدل درجه دوم با ضریب تعیین (R^2=0/99) می‌باشد. این رابطه در معادله 3 نشان داده شده است که در آنها X_1 و X_2 به‌ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و Y قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌باشد.

$$Y= 109/96 + 6/5022 X_1 -125/92 X_2 + 2/98299 X_1^2 +47/3069X_2^2 -6/8633X_1X_2 \qquad (5)$$

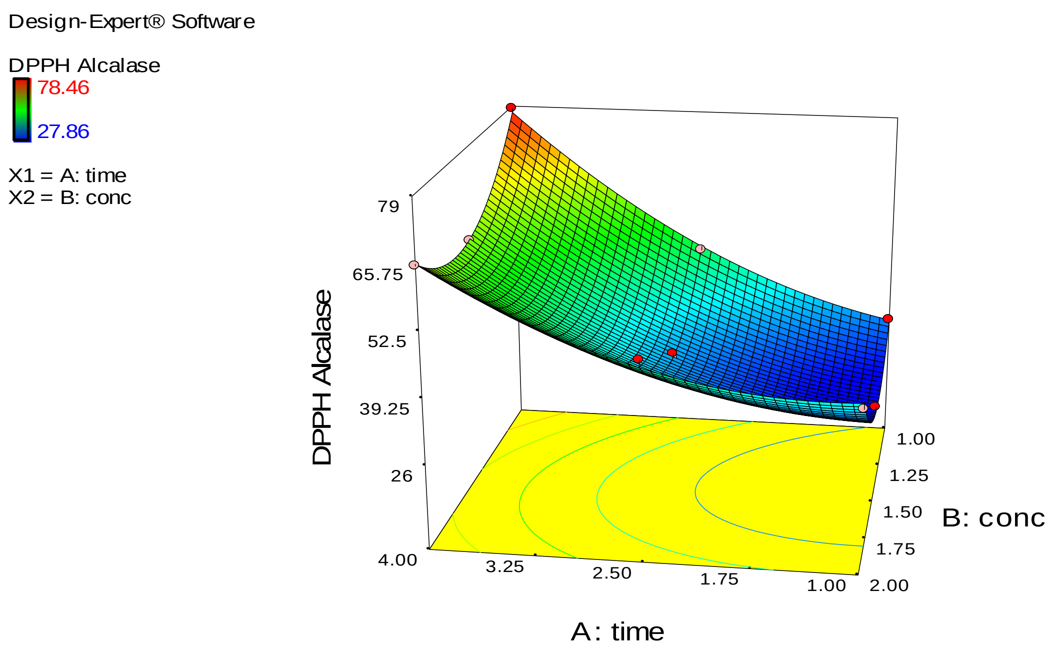
نتایج جدول 3 نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده‌گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد (R^2=0/99). در تمامی تیمارها اثر زمان بر میزان مهار رادیکال DPPH معنی‌دار بود، اما اثر غلظت آنزیم معنی‌دار نبود (P=0/2709). همچنین نتایج اثر درجه دوم هریک از متغیرها و اثر متقابل متغیرها را بر روی پاسخ آزمایش معنی‌دار نشان می‌دهد (P<0/0001). همچنین جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این آزمایش از آزمون عدم برازش مدل (Lack of fitness) استفاده شد که با توجه به نتایج جدول، این فرض معنی‌دار نشد (P>0/05). این مسئله بیانگر آن است که مدل به‌خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

جدول3- جدول تجزیه واریانس برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

	درجه آزادی	ضریب رگرسیون	عدد P
مدل	5	109/96	<0/0001
X_1(زمان)	1	6/50228	<0/0001
X_2(غلظت آنزیم)	1	-125/92	0/2709
X_1^2	1	2/98299	<0/0001
X_2^2	1	47/3069	<0/0001
X_1X_2	1	-6/8633	<0/0001
Lack of fitness	3		0/1397
R^2- Pred		0/99	
R^2- Adj		0/97	

نمودار صفحه‌ای اثر زمان و غلظت آنزیم را بر روی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با آنزیم‌های آلکالاز در شکل 5 نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز، 78/48 درصد بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم 1 درصد و مدت زمان هیدرولیز 4 ساعت می‌باشد. به‌طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز، با افزایش زمان هیدرولیز تا چهار ساعت، روند تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH، ابتدا کاهشی و سپس افزایشی بود. جی و همکاران (2009) که ضایعات ماهی تون را با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز کردند، اعلام داشتند که میزان فعالیت آنزیم آلکالاز با افزایش مقدار آنزیم افزایش یافت. آنها اعلام کردند که پپتیدهای با وزن مولکولی بین 1 تا 3 کیلودالتون بیشترین قدرت مهار رادیکال را دارند. مارینوا و همکاران (2010)، با استفاده از چهار ساعت هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل، پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال DPPH به میزان 46 درصد دست پیدا کردند، در حالیکه در پژوهش حاضر، با چهارساعت هیدرولیز، قابلیت مهارکنندگی به 78/48 رسید و سپس کاهش یافت. پیشرفت فرایند هیدرولیز منجر به رهاسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از زنجیره-های پروتئینی می‌گردد ولی ادامه فرایند هیدرولیز ممکن است باعث کاهش این فعالیت شود. در این زمینه لاسود و همکاران (2015)، نشان دادند بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ماهیچه هیدرولیز شده، 51 درصد بود، در حالیکه این میزان در ماهیچه هیدرولیز نشده 25 درصد گزارش شد. این مقدار در مقایسه با مقدار به‌دست‌آمده در این پژوهش پایین‌تر است. آنها بیان کردند پپتیدهایی که دارای کمترین درجه هیدرولیز بود، بالاترین آبگریزی و بالاترین قدرت مهار رادیکال DPPH را از خود نشان

دادند. هیدرولیز آنزیمی بیشتر، باعث کوتاه‌تر شدن زنجیره‌های پپتیدی و افزایش آب‌دوستی آنها شد وکارایی آنها در مهار رادیکال DPPH کاهش یافت. ژانگ و همکاران(2014)، اعلام کردند پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از 1 کیلودالتون بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را دارا هستند. مارینوا و تچوربانو (2010)، با استفاده از پروتئیناز و آمینوپپتیدازهای با منشاء گیاهی از جمله بروملائین آناناس، آمینوپپتیداز و پرولین ایمینوپپتیداز برگ کلم و آمینوپپتیداز نخود، به هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل پرداختند و ویژگی‌های مهارکنندگی رادیکال DPPH پپتیدهای به‌دست‌آمده را مورد بررسی قرار دادند. آنها اعلام کردند که میزان مهار رادیکال گرده از 28 درصد قبل از هیدرولیز به ماکزیمم 46 درصد بعد از هیدرولیز افزایش یافت.



شکل 5- نمودار سطحی برای قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH توسط گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم آلکالاز (درصد)

فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ‌های فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE گرده هیدرولیز شده در جدول 4 ذکر شده است. تجزیه‌وتحلیل سطح پاسخ نشان می‌دهد که رابطه فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE گرده هیدرولیز شده با متغیرهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب تعیین (R^2=0/99) می‌باشد. این رابطه در معادله 4 نشان داده شده است که در آنها X_1 و X_2 به‌ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و Y قدرت مهارکنندگی آنزیم ACE می‌باشد.

$$Y=169/981 -- 16/3143X_1 + 334/068X_2 + 2/05885\ X_1^2 -116/29X_2^2 + 8/4133X_1X_2 \qquad (6)$$

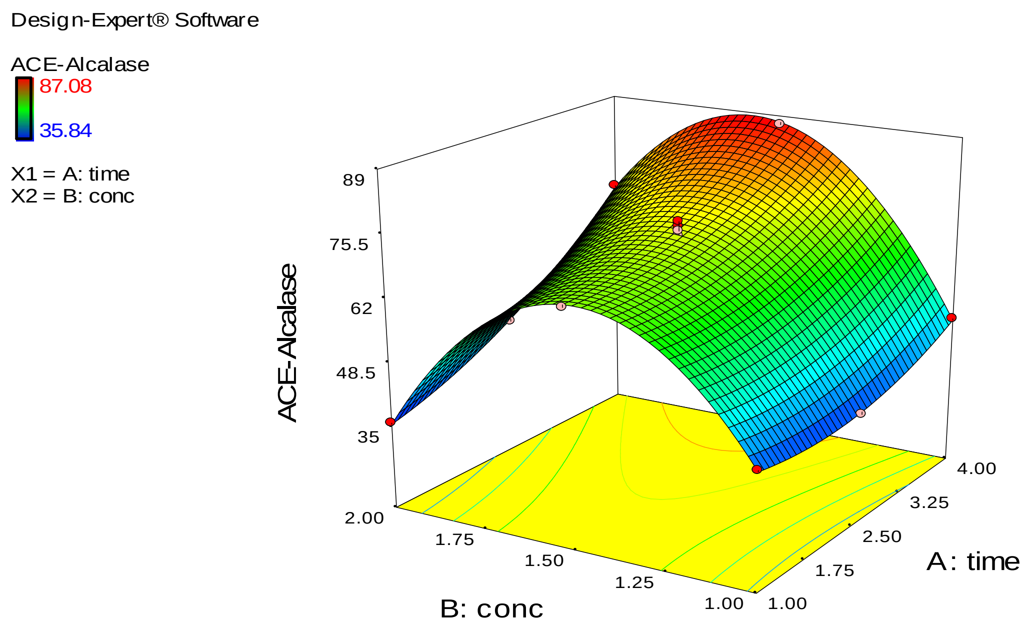
نتایج جدول 4 نشان می‌دهد مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد (R^2=0/99). اثر متغیر زمان و غلظت آنزیم بر میزان مهار آنزیم ACE توسط تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز معنی‌دار بود (P<0/0001). همچنین نتایج، اثر درجه دوم و اثر متقابل هریک از متغیرها را بر روی پاسخ آزمایش معنی‌دار نشان می‌دهد (P<0/0001). همچنین جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این آزمایش از آزمون عدم برازش مدل (Lack of fitness) استفاده شد که با توجه به نتایج جدول، این فرض معنی‌دار نشد (P>0/05). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال ACE گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

نمودار صفحه‌ای اثر زمان و غلظت آنزیم را بر روی فعالیت آنزیم ACE گرده هیدرولیز شده با آنزیم‌های آلکالاز در شکل 6 نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، بیشترین قدرت مهار ACE تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز، 87/07 بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم 1/5درصد و مدت زمان هیدرولیز 4 ساعت می‌باشد. قدرت مهار ACE ژله رویال 64/3 درصد بود. به‌طور واضحی مشخص است هیدرولیز آنزیمی گرده گل با آلکالاز

منجر به تولید پپتیدهایی شده است که قدرت مهار آنزیم ACE آنها از نظر عددی بالاتر از قدرت مهار آنزیم ژل رویال است.

جدول4- جدول تجزیه واریانس برای فعالیت مهارکنندگی آنزیم ACE

	درجه آزادی	ضریب رگرسیون	عدد P
مدل	5	-169/981	<0/0001
X_1(زمان)	1	-16/3143	<0/0001
X_2(غلظت آنزیم)	1	334/068	0/0001
X_1^2	1	2/05885	<0/0001
X_2^2	1	-116/29	0/0001
X_1X_2	1	8/41333	<0/0001
Lack of fitness	3		0/7295
R^2- Pred		0/99	
R^2- Adj		0/99	



شکل 6- نمودار سطحی برای قدرت مهارکنندگی آنزیم ACE توسط گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم آلکالاز (درصد)

کاسکیوتا و همکاران (2016)، نشان دادند با افزایش مدت زمان هیدرولیز پروتئین آرد سویا با آنزیم کرولاز تا ده ساعت، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از 3 کیلودالتون تولید شد و با افزایش مدت زمان هیدرولیز، قدرت بازدارندگی ACE افزایش یافت. جی و همکاران (2009)، بیشترین میزان قدرت بازدارندگی ACE در پروتئین جگر ماهی تن هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف آلکالاز، نوترئاز، فلاورزایم، پروتئومیکس را 36 درصد گزارش کردند که در مقایسه با بیشترین میزان بازدارندگی در پژوهش حاضر بسیار پایین‌تر است. لاسود و همکاران (2015)، اثر بازدارندگی ACE ماهیچه‌های هیدرولیز شده با چند پروتئاز را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی ACE مربوط به غلظت‌های 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم نوترئاز با میزان 87 درصد و بعد از آن مربوط به تیمار هیدرولیز شده با آلکالاز، 84 درصد بود. این مقدار با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش قابل مقایسه بود. نصری و همکاران نشان دادند که قدرت بالای بازدارندگی ACE ماهیچه هیدرولیز شده ارتباط زیادی با حضور پپتیدهای کوتاه زنجیر دارد. در پژوهش حاضر نیز در تیمارهای هیدرولیز شده، بیشترین قدرت بازدانگی ACE در بیشترین مدت زمان هیدرولیز به‌دست آمد؛ زیرا

پس از سپری شدن مدت زمان طولانی‌تر، پپتیدهای کوتاه زنجیرتر تشکیل می‌گردند. اما به‌طور کلی تفاوت در میزان بازدارندگی ACE ممکن است به دلیل تفاوت در ویژگی آبگریزی- آبدوستی پپتیدها، وزن مولکولی و ترتیب اسید آمینه در پپتیدهای حاصله باشد. میزان بالای ویژگی آبدوستی بودن پپتیدها باعث می‌شود قابلیت دسترسی انها به جایگاه فعال آنزیم ACE کاهش یابد؛ بنابراین وجود تعادل در ویژگی آبدوستی- آبگریزی پپتیدها بسیار حائز اهمیت است.کتاری و همکاران (2014)، نشان دادند میزان بازدارندگی 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده ماهی 80/5 درصد و بود که مقدار آن، با توجه به غلظت پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده، با بیشترین مقادیر بازدارندگی ACE در پژوهش حاضر قابل مقایسه است. همچنین آنها اعلام کردند که بالاترین میزان بازدارندگی ACE مربوط به پپتیدهایی بود که ویژگی آبگریزی بالایی داشتند، زیرا پپتیدهای آبگریز جاذبه بیشتری به قرارگیری در مکان فعال آنزیم ACE از خود نشان دادند. به‌طور کلی مشخص شد که بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار آنزیم ACE گرده گل، به مقدار قابل‌توجهی از قدرت مهار آنزیم ACE ژله رویال بیشتر شد. این مسئله نشان می‌دهد که قدرت مهار آنزیم ACE ژله رویال، مربوط به پروتئیین‌ها و پپتیدهایی است که به‌طور طبیعی در ژله رویال وجود دارند. بالاتر بودن قدرت مهار آنزیم ACE در گرده های هیدرولیز شده در شرایط آزمایشگاه، نسبت به ژله رویال را می‌توان به تولید پپتیدهای زنجیر کوتاه تر با ویژگی آبگریزی- آبدوستی مناسب، وزن مولکولی کمتر و ترتیب اسید آمینه‌های خاصی که در شرایط هیدرولیز آزمایشگاهی حاصل شده‌اند، نسبت داد (نصری، 2013).

ارزیابی اعتبار مدل آماری

شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به‌وسیله نرم‌افزار پیش‌بینی شد. این شرایط شامل مدت زمان 3/95 ساعت و غلظت آنزیم 1/5 درصد بود. پیش‌بینی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و قدرت مهارکنندگی آنزیم ACE به‌ترتیب 59/14 درصد، میزان جذب 0/7 و 87/08 درصد با میزان مطلوبیت 0/91 بود. جهت ارزیابی اعتباری مدل آماری، یک آزمایش اضافه تحت شرایط مذکور انجام شد که در آن فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و قدرت مهارکنندگی آنزیم ACE، به‌ترتیب 57/761 درصد، میزان جذب 0/68 و 86/793 درصد به‌دست آمد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که میزان پیش‌بینی شده عوامل توسط مدل با مقداری که به‌صورت آزمایشی به‌دست‌آمده است، تطابق دارد. این شرایط بیانگر آن است که مدل به صورت مناسبی می‌تواند اثر دو متغیر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و قدرت مهارکنندگی آنزیم ACE گرده هیدرولیزشده نشان دهد.

نتیجه‌گیری

با انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH از 67/33% در گرده هیدرولیز نشده، به 78/48% در گرده هیدرولیز شده با آلکالاز، و قدرت مهار آنزیم ACE گرده گل، از 15/54% در گرده هیدرولیز نشده، به 87/07% در گرده هیدرولیز شده با آلکالاز، ارتقا پیدا کرد. بنابراین بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال و آنزیم ACE گرده گل، با ژله رویال قابل مقایسه شد. با توجه به اینکه تنها منبع اصلی پروتئینی زنبور برای تهیه ژله رویال، گرده گل است، می‌توان ادعا کرد که با هیدرولیز شدن پروتئین‌های گرده گل، تا حدی می‌توان آنها را به پپتیدهای موجود در ژله رویال نزدیک کرد.

منابع

Almeida, J. F., Reis, A. S., Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., Moura, C., Plata-Oviedo, M. V., Haminiuk, C. W.I., Ribeiro, I. S., Luz, C. F. P. And Carpes, S. T. 2016. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 1-7.

Arabshahi, S., Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavenois, phenols and indigoids. The role of B-carotene in antioxidants functions. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81, 559- 568.

Bogdanov, S. 2014. Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health, Medicine: A Review. Bee Product Science, 28 (3), 118-153.

Bougatef.A; Hajji.M; Balti.R. 2009. Antioxidant and free radical – scavenging activities of smoth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases.*journal of food chemistry*, 1198-1255.

Coscueta, R. F., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., Pintado, M. A. 2016. Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198, 36–44.

Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K. Kadri, A., Gharsallah, N. 2015. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date PalmPollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*, 48, 437-447.

Deshpande, S., Chryan, M., Salunkhe, D. 1987. Tanin analysis of food products. Critical review in food nutrition, 24, 41- 49.

Guerar, F., Guimas, l., Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymati*c, 19, 489-498.

Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahara, Y., Morimatsu, F. 2009. Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Journal of Nutural Science and Vitaminology*, 54, 191–195.

Guo, H., Kozuma, Y., & Yonekura, M. 2005. Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate. *Food Science Technology Research*, 11, 222–230.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., Nasri, M. 2011. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. *Food Research International*, 44, 2703-2711.

Je, J. Y., Lee, M. H., Lee, K. h. Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266-1272.

Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., & Chibata, I. 1979. Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives.*Chemical Pharmacological Bulletin*, 27, 1912–1916.

Khantaphant, S., Benjakul, S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151, 110-115.

Kishimura. H., Benjakul.S. 2011. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle nof brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, 318-327.

Klompong, V., Benjakul. S., Kantachote, D., Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally. *Food chemistry*, 102 (13), 17-27.

Kroyer. G., Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 171-174.

Ktari, N., Nasri, R., Mnafgui, K., Hamden, K., Belguith, O., Boudaouara, T., Feki, A., Nasri, M. 2014. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats, 5113 (14), 73-77.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M., C., Barkia, A., Nasri, M. 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics.*

Leblanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, A. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115, 1299–1305.

Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L.S., Peng, C. C. 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56 (23), 11447-11452.

Mao, W. Y., Cheng, X., Wang, X., Wu, S. I. 2011. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 126 (2011), 484–490.

Marghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., Campos, M. S., 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115, 878–883.

Marinova, M., Tchorbanov, P. 2010. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Honeybee-Collected Pollen Using Plant Enzymes. *Enzyme Research,* 41, 5949-50.

Matsuoka,T., Kawashima,T., Nakamura, T.,Kanamaru,Y., Yabe, T. 2012. Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, Apis mellifera. *Apidologie*, 43, 685–697.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L.M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: Palynological origin phenolic content antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1096-1101.

Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Myoda, T., Nagashima, T. 2005. Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen Cistus ladaniferus. *International Journal of Molecular Medicine*, 15(2), 259-63.

Nagai, T., & Inoue, R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract from royal jelly.*Food Chemistry*, 84, 181–186.

Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Arroume, N., Dhulster, P., Nasri. M., Châabouni, M.K., 2013. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterissessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54, 552–561.

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., L, M. Estevinho. 2013. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology.*

Salampessy, J., Reddy, N., Kailasapathy, K., Phillipsa, M. 2015. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory

peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of Functional Foods*, 14, 716-725.

Sun, L., Powers, J. R., and Tang, J. 2007. Evaluation of antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105, 101- 106.

Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F. 1999. Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 1455-1460.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104-111.

Zhang, M., Mu, T.-H., & Sun, M.-J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7, 191–200.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 2, June. July. 2018, p. 243- 257

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 2، خرداد- تیر 1397، ص. 257-243

Optimization of production of bioactive peptides through the enzymatic hydrolysis of bee pollen protein by Alcalase and comparison with the royal jelly

A. Maqsoudlou, A. Sadeghi Mahoonak*[2], M. Ghorbani[2], F. Toldra[3]

Received: 2016.11.21
Accepted: 2017.04.22

Introduction: Bee pollen, commonly referred as the ‘‘life-giving dust’’, results from the agglutination of flower pollens with nectar using salivary substances of the honeybees (Almeida-Muradian et al., 2005). Pollen contains 10 to 40% protein, 1 to 13% lipid, 13 to 55% carbohydrates and 2 to 6% minerals. Royal Jelly is produced by enzymatic digesting of bee pollen by proteases and other natural enzymes. Based on dry weight, it contains 27-41% protein, 30% carbohydrates, 8-19% lipids, minerals, trace elements and some vitamins (Sabatini *et al*., 2009; Wytrychowski *et al*., 2013). The antioxidant properties of royal jelly and bee pollen, are related to main proteins and phenolic compounds and flavonoids (Nagai and Inue, 2004). The antioxidant activity of peptides can be evaluated using DPPH, radicals scavenging activity, Ferric reducing, Ferrous chelating activity (Khantaphant *et al.*, 2011). Antioxidant and ACE inhibitory activity of pollen, royal jelly and peptides were investigated by different researchers (Bogdanov, 2014; Morais *et al.*, 2011; Salampessy *et al.*, 2015; Marinova and Tchorbanov, 2010; Wiriyaphan *et al*., 2012). The objective of present research was optimization of enzymatic hydrolysis of bee pollen protein by Alcalase according to its antioxidant and ACE inhibitory activity compared to royal jelly.

Materials and methods: The preparation of the bee pollen extract was performed by mixing the bee pollen with water (1:10) (w/v). The macerates were filtered and centrifuged at 12000 g. The obtained supernatant was lyophilized. The royal jelly extract were prepared using method described by Liu et al., 2008. The total phenolic content of the extracts was recorded using the Folin–Ciocalteu method (Moreira et al., 2008). DPPH radical-scavenging activity was determined as described by Bersuder, Hole, and Smith (1998). The ability of the hydrolysate to reduce iron (III) was determined according to the method of Bougatef et al. (2008). Bee pollen was added and homogenized with 5 volumes of distilled water. pH and temperature of the solution were adjusted to pH=8 and 50°C. Alcalase in the concentration range of 1 to 2% w/w were added to the pollen protein solution. Enzymatic hydrolysis performed during different times 2 to 5 hours. Hydrolysis was stopped by heating at 80˚C for 10 min. The hydrolysats were centrifuged at 4000x g for 30 min to remove the residue. The supernatants were pooled and then lyophilized (Matsuoka *et al*., 2012). DPPH radical scavenging ability and reducing power of pollen hydrolysates of pollen hydrolysates were measured. Also ACE-inhibitory activity of pollen hydrolysates was measured was assayed by method reported by Nakamura *et al*. (1995). Statistical analysis of results before hydrolysis was done by SPSS. Optimization of enzymatic hydrolysis was done by Response Surface Methodology (RSM) in Design Expert software.

Results and discussion: Total phenol value measured for pollen ranged between 48.15 to 174 mg Gallic acid/g for royal jelly ranged from 9.24 to 87.261 mg Gallic acid/g. Considering that royal jelly is obtained by direct digestion of pollen, the amounts of their phenolic compounds were comparable (Bogdanov, 2014). Phenolic compounds increased by increasing concentration royal jelly and pollen extract in dose dependent manner. Increasing concentrations of royal jelly in range of 300 to 1000 mg/l was more effective than pollen ($p<0.05$). Different concentrations of pollen and royal jelly extracts showed various reducing between 0.29 to 0.8 and 0.74 and 0.77, respectively. The lowest and highest DPPH radical scavenging were 1.05 and 67.33 in pollen

1 and 2. PhD student and Associate Professor, Department of Food Science & Technology, Food Chemistry, Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, Iran.
3. Professor -Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenue Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain.
(*Corresponding author Email: sadeghiaz@gmail.com)

and 3.75 and 95.27 in royal jelly, respectively. DPPH radical scavenging of pollen and royal jelly increased significantly by increasing concentration of extracts ($p<0.05$). There was a significant difference in DPPH radical scavenging of extracts using the highest concentrations of them ($p<0.05$). DPPH radical scavenging of phenolic extracts was increased by increasing their concentration. Royal jelly demonstrated more DPPH radical scavenging activity than pollen that was attributed to its proteins and peptides and their side chains.

The highest reducing power was 0.756 that obtained in samples hydrolyzed by Alcalase 1.5 % and hydrolysis time 2.5 hours. The highest scavenging power of DPPH radicals, in samples hydrolyzed by Alcalase 1% for 4 hours, was 78.48%. The highest ACE inhibitory activity, in samples hydrolyzed by Alcalase 1.5% for 4 hours, was 87.07%. Results showed radical scavenging power of pollen increased from 67.33% to 78.48% and ACE inhibitory activity of pollen increased from 15.54% to 87.07% by hydrolysis. After hydrolysis, radical scavenging power and ACE inhibitory activity of pollen was partly comparable with Royal Jelly. Because the pollen protein is the only source of royal jelly protein, it is possible to simulate the peptides constitute of Royal Jelly by hydrolysis of pollen proteins.

Key words: Angenoteinssin Converting Enzyme, bee pollen, royal jelly, antioxidant activity, Alcalase, bioactive peptides, optimization.